CO_2-Fixierung und Intermediärstoffwechse bei Chromatium okenii Perty

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hans Georg Trüper

aus Bremen-Farge

Göttingen 1964

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie
der
Georg-August-Universität zu Göttingen durchgeführt.

R. DAVO
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

D 7

Referent: Professor Dr. H.G. Schlegel

Korreferent: Professor Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 1964

Archiv für Mikrobiologie 49, 23—50 (1964)

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

CO_2-Fixierung und Intermediärstoffwechsel bei Chromatium okenii Perty*

Von

HANS G. TRÜPER

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. März 1964)

Thiospirillum jenense und *Chromatium okenii* wurden auf Grund ihrer auffälligen Massenentwicklung sowie ihrer Zellgröße schon 1838 durch EHRENBERG entdeckt; sie sind seitdem als Rohkulturen zu reizphysiologischen Untersuchungen mehrfach herangezogen worden. Die für die Erforschung der Stoffwechselphysiologie der *Thiorhodaceae* und die gesamte Photosyntheseforschung richtungweisenden Untersuchungen führte VAN NIEL (1932, 1936, 1941) jedoch an Reinkulturen kleinerer Formen (*Chromatium, Thiocystis*) durch. Seit VAN NIEL *Chromatium warmingii* vorübergehend in Kultur halten konnte, sind bis 1962 keinerlei Arbeiten über den Stoffwechsel von *Chromatium okenii*, *Thiospirillum jenense* und *Chromatium warmingii* publiziert worden. Erstmals gelang es SCHLEGEL u. PFENNIG (1961), diese drei Arten unbegrenzt lange im Laboratorium in Anreicherungskulturen zu erhalten. Die Ausarbeitung einer vollsynthetischen Nährlösung durch PFENNIG (1961) ermöglichte dann auch die Isolierung einzelner Stämme dieser Arten und ihre stoffwechselphysiologische Erforschung.

Untersuchungen zur Speicherstoffsynthese an *Chromatium okenii* ergaben, daß Kulturen mit Acetat als Kohlenstoffquelle erhebliche Mengen Poly-β-hydroxybuttersäure speichern (SCHLEGEL 1962a, 1962b; SCHLEGEL u. GOTTSCHALK 1962; KRAN 1964), die in gleicher Weise wie bei *Hydrogenomonas* (SCHLEGEL et al. 1961) synthetisiert wird (STAHL, persönliche Mitteilung). Mit CO_2 als Kohlenstoffquelle sowie mit bestimmten organischen Säuren speichert *Chromatium okenii* Polysaccharide (SCHLEGEL 1962a, 1962b; KRAN 1964). Bei der Untersuchung der Carotinoide der großen *Thiorhodaceae* wurden die bisher unbekannten Carotinoide Okenon und Warmingon entdeckt (SCHMIDT et al. 1963; LIAAEN JENSEN u. SCHMIDT 1963).

Fast alle übrigen Kenntnisse über die Stoffwechselphysiologie von *Thiorhodaceae* stammen aus Untersuchungen mit dem von ROELOFSEN

* Auszug aus der gleichlautenden Dissertation der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen 1964.

(1934) isolierten *Chromatium* Stamm *D*, dessen genaue Artzugehörigkeit wegen der systematischen Unklarheit unter den „kleinen" *Thiorhodaceae* unsicher ist. Infolgedessen sind vor allem biochemisch ausgerichtete Mikrobiologen vielfach geneigt, diese Erkenntnisse als Eigenschaften der *Thiorhodaceae* schlechthin zu betrachten. Es schien daher angebracht, *Chromatium okenii* als einen schon morphologisch von Stamm *D* recht verschiedenen Vertreter der gleichen Gattung näher zu untersuchen und somit zu prüfen, wie weit die üblich gewordenen Verallgemeinerungen gerechtfertigt sind.

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem von PFENNIG (1961) isolierten *Chromatium okenii* Perty Stamm *Ostrau* durchgeführt. Ihr Ziel war die Untersuchung der wichtigsten CO_2-Fixierungsreaktionen sowie der von ihnen ausgehenden Stoffwechselwege zur Synthese von Kohlenhydraten und Aminosäuren.

Material und allgemeine Methoden

Anzucht der Bakterien. Chromatium okenii Perty Stamm *Ostrau* wurde bei 200 Lux in 500 ml-Schraubdeckelflaschen in der von PFENNIG (1961) entwickelten Nährlösung herangezogen (SCHMIDT et al. 1963). Die Sterilisation erfolgte durch Seitz-Filtration (EKS, Gr. 14; N_2-Druck).

Zellprotein wurde nach der Biuret-Methode bestimmt (LA RIVIÈRE 1958; SCHMIDT et al. 1963).

Radioaktivitätsmessungen. Die Bestimmung des von den Bakterien eingebauten Radiokohlenstoffs erfolgte durch Niederschlagen der Zellen auf Membranfilter (Göttinger Membranfiltergesellschaft) und Auszählen der auf Messingblöcken befestigten Proben (SCHLEGEL u. LAFFERTY 1961). Die benutzten Meßgeräte waren das Zählgerät FH 49, der Probenwechsler FH 448, und der Zeitdrucker FH 449 der Fa. Friesecke & Hoepfner, Erlangen.

Herstellung zellfreier Extrakte. Die Bakterien wurden in einer Hughes-Presse auf $-40°$ C abgekühlt und dann mit Hilfe einer hydraulischen Presse durch schmale Schlitze gedrückt (HUGHES 1951). Der Zellbrei wurde in 0,05 m Tris-Puffer[1], pH 7,6, der je 100 ml 37 mg EDTA und 30 mg Cystein (pH 7,0) enthielt, aufgenommen, bei $+4°$ C kurz nach POTTER u. ELVEHJEM (1935) homogenisiert und in einer Christ-Omikronzentrifuge bei 0° C abzentrifugiert ($10^5 \times g$). Chromatophoren suspensionen wurden durch Aufschwemmen der obersten Sedimentationsschicht erhalten. *Proteinbestimmungen* in zellfreien Extrakten erfolgten nach BÜCHER (1947). Die Proteingehalte zellfreier Extrakte lagen im Bereich 5—15 mg/ml.

Enzymaktivität. Eine Einheit (E) der spezifischen Aktivität ist definiert als 1 μMol Substratumsatz/min/mg Protein im Rohextrakt. 1 E = 1000 mE.

[1] Abkürzungen: ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat, CoA = Coenzym A, EDTA = Äthylendiamintetraacetat, FDP = Fructosediphosphat, F-6-P = Fructose-6-phosphat, G-1-P = Glucose-1-phosphat, G-6-P = Glucose-6-phosphat, GSH = Glutathion, IDP = Inosindiphosphat, Imp = Impulse, ITP = Inosintriphosphat, NAD = Nicotinamidadenindinucleotid, NADP = Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, OAC = Oxalacetat, P_a = anorganisches Phosphat, PEP = Phosphoenolpyruvat, PG = Phosphoglycerat, PP_a = anorganisches Pyrophosphat, RuDP = Ribulosediphosphat, R-5-P = Ribose-5-phosphat, TES = Trichloressigsäure, TPP = Thiaminpyrophosphat, Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, UDPG = Uridindiphosphatglucose.

Enzyme und Substrate für die enzymatischen Bestimmungen stammten vorwiegend von der Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim. Acetyl-CoA und Propionyl-CoA wurden freundlicherweise von Herrn Dr. R. M. Lafferty, RuDP von Herrn Dr. G. Gottschalk zur Verfügung gestellt.

Kurzzeit-$^{14}CO_2$-Einbauversuche wurden in der Rührcuvette (Abb. 1—3) bei 2000 Lux durchgeführt. Die Aufarbeitung der Proben (Extraktion mit Äthanol bei —20° C) erfolgte gemäß der Arbeitsmethode von Knight (1962).

Chromatographie. Unter Befolgung der von Hirsch (1963) gegebenen Vorschrift wurden die aus den $^{14}CO_2$-Einbauversuchen erhaltenen Extrakte absteigend zweidimensional aufgetrennt. Für die Herstellung von Radioautogrammen wurden die Chromatogramme 5 Wochen lang mit dem Agfa-Röntgenfilm „Radiolix blau" in direkten Kontakt gebracht.

Bestimmung von Enzymaktivitäten

Ribulosediphosphat-Carboxylase (Peterkofsky u. Racker 1961; Gottschalk 1964).

Phosphoriboisomerase-Phosphoribulokinase-System (Racker 1957). — *Fructose-1,6-diphosphatase* (Racker u. Schroeder 1958).

Phosphoglycerat-Kinase, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, Triosephosphat-Isomerase, Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase, Phosphoglucose-Isomerase, Phosphoglucomutase, Pyruvat-Kinase, Alkohol-Dehydrogenase, Hexokinase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und *Phosphoglycerat-Mutase* (Boehringer-Informationen 1961; vgl. auch Gottschalk 1964). *Enolase*: Ansatz wie bei Phosphoglycerat-Mutase, nur wurde anstatt Enolase Phosphoglycerat-Mutase als Hilfsenzym eingesetzt.

Fructose-1-phosphat-Aldolase (Wolf 1962).

Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Suzuki u. Werkman 1958). Modifizierter Ansatz: 0,9 ml 0,1 m Tris-Puffer pH 7,4; 0,1 ml 0,1 m Na-Oxalacetat pH 7,0; 0,15 ml ITP (10 mg/ml); 0,20 ml GSH (30 mg/ml) neutralisiert; 0,15 ml 0,3 m $NaH^{14}CO_3$ (28300 Imp/min/μMol) und 0,50 ml Rohextrakt. Der Ansatz wurde unter N_2 bei 31° C im thermokonstanten Wasserbad 15 min inkubiert. Nach Abtöten mit 0,10 ml 6 n HCl wurde 1 ml des Ansatzes mit 5 mg fester Oxalessigsäure versetzt und nach deren Lösung 1 ml einer 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung zugefügt. Nach etwa 10 min wurde die Probe auf ein Membranfilter gesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Membranfilter wurde in üblicher Weise auf einen Messingblock aufgezogen, über $CaCl_2$ im Vacuum getrocknet und die Radioaktivität bestimmt.

Die 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung wurde wie folgt hergestellt (Shriner et al. 1956): 0,4 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden in 2 ml konz. H_2SO_4 unter Schwenken gelöst und 3 ml Wasser zugegeben. Die warme Lösung wurde mit 10 ml 95%igem Äthanol versetzt und war dann gebrauchsfertig.

Pyruvat-Carboxylase (Suzuki u. Werkman 1958). Modifizierter Ansatz: 0,44 ml 0,1 m Tris-Puffer pH 7,4; 0,05 ml 0,1 m $MgCl_2$; 0,10 ml ATP (10 mg/ml); 0,10 ml 0,1 m Na-Pyruvat; 0,01 ml Acetyl-CoA oder Propionyl-CoA (etwa 10 μMol/ml); 0,10 ml 0,3 m $NaH^{14}CO_3$ (28300 Imp/min/μMol) und 0,10 ml Rohextrakt. Aufarbeitung wie vorstehend.

Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Utter u. Kurahashi 1955). Ansatz: 0,02 ml 0,1 m $MnCl_2$; 0,10 ml GSH (30 mg/ml) neutralisiert; 0,10 ml ITP (10 mg/ml); 0,20 ml 0,3 m Na-Oxalacetat; 0,33 ml Wasser. Dieser Teilansatz wurde 7 min unter N_2 bei 38° C vorinkubiert. Dann wurden 0,10 ml Rohextrakt und 0,15 ml 0,3 m $NaH^{14}CO_3$ (28300 Imp/min/μMol) zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 min wurde mit 0,10 ml 10 m H_2SO_4 abgetötet, abzentrifugiert und 0,10 ml

des Überstehenden auf Aluminiumfolie mit Josephs-Papier aufgetragen. Nach Trocknen über $CaCl_2$ im Vacuum bei 4° C wurde die Radioaktivität der Probe bestimmt.

Propionyl-CoA-Carboxylase und *Acetyl-CoA-Carboxylase* (TIETZ u. OCHOA 1962). Modifizierter Ansatz: 0,25 ml 0,1 m Tris-Puffer pH 8,0; 0,05 ml 0,1 m $MgCl_2$; 0,10 ml 0,1 m GSH, neutralisiert; 0,10 ml ATP (10 mg/ml); 0,10 ml Propionyl- oder Acetyl-CoA (10 µMol/ml); 0,20 ml 0,3 m $NaH^{14}CO_3$ (28300 Imp/min/µMol) und 0,20 ml Rohextrakt. Der Ansatz wurde 15 min bei 31° C unter N_2 inkubiert, dann mit 0,20 ml 20%iger TES abgetötet und abzentrifugiert. 0,20 ml des Überstehenden wurden auf Aluminium-Planchets aufgetragen, unter einer Infrarotlampe getrocknet und ausgezählt.

Malic enzyme (OCHOA 1955a).

Condensing enzyme (DIXON u. KORNBERG 1959). Modifizierter Ansatz: 0,40 ml 0,1 m Tris-Puffer pH 8,0; 0,01 ml 0,5 m $MgSO_4$; 0,005 ml Acetyl-CoA (12 µMol/ml); 0,02 ml 0,1 m Na-Oxalacetat, neutralisiert; Wasser und Rohextrakt, Endvolumen 1,00 ml. 0,5 cm-Quarzcuvetten, Meßwellenlänge 232 nm.

Pyruvat-Transacetase. Ansatz wie vorstehend, nur wurde statt Oxalacetat Pyruvat eingesetzt.

Malat-Synthetase und *Isocitratase* (DIXON u. KORNBERG 1959).

Isocitrat-Dehydrogenase (OCHOA 1948). Modifizierter Ansatz: 2,68 ml 0,05 m Tris-Puffer pH 7,3; 0,10 ml 0,1 m $MgCl_2$; 0,10 ml 0,04 m K-Isocitrat; 0,10 ml NADP bzw. NAD (10 mg/ml); 0,02 ml Rohextrakt.

Aconitase. Ansatz wie vorstehend, nur wurde Citrat anstatt Isocitrat eingesetzt. (Test nur qualitativ.)

α-Ketoglutarat-Dehydrogenase (KAUFMAN 1955). — *Malat-Dehydrogenase* (OCHOA 1955b). — *Acetyl-CoA-Bildung aus Pyruvat* (SCHINDLER 1964). — *Acetat-aktivierendes Enzym* (ROSE 1955). — *Glutamat-Dehydrogenase* (STRECKER 1955). — *α-Alanin-Dehydrogenase* (WIAME et al. 1962). — *Glycin-Dehydrogenase*: Ansatz wie vorstehend, nur wurde anstatt Pyruvat Glyoxylat eingesetzt.

Transaminasen (SMITH 1963). Modifizierter Ansatz: 0,10 ml α-Ketosäure (30 µMol) als NH_2-Acceptor; 0,05 ml Aminosäure (10 µMol) als NH_2-Donator; 0,05 ml Pyridoxalphosphat (1 µMol); 0,40 ml Rohextrakt und 0,40 ml 0,05 m K-Phosphat-Puffer pH 7,8. Die Ansätze wurden 30 min bei 34° C inkubiert, durch 3 min Einhalten in kochendes Wasser abgetötet und abzentrifugiert. Das Überstehende wurde Dünnschicht-chromatographisch (BRENNER et al. 1962) untersucht. Steigflüssigkeit: Äthanol/Wasser 7:3; Dünnschicht: Cellulosepulver mit Gipszusatz „Macherey, Nagel & Co. 300 MG". Die Aminosäuren wurden durch Besprühen mit Ninhydrinlösung sichtbar gemacht.

Versuche und Ergebnisse

A. CO_2-Fixierung durch ganze Zellen unter Wachstumsbedingungen

Untersuchungen zum Schwefelstoffwechsel (TRÜPER 1964) hatten ergeben, daß *Chromatium okenii* nur mit Sulfid oder intracellulär gespeichertem Schwefel als H-Donator CO_2 fixieren kann. Zudem hatten sich die Zellen als außerordentlich sauerstoffempfindlich erwiesen. Zur Untersuchung der CO_2-Fixierung durch ganze Zellen war es notwendig, ein Gefäß zu entwickeln, das die folgenden Anforderungen erfüllte:

1. Strikt anaerobes Arbeiten, da einerseits Sulfid vom Luftsauerstoff besonders im Licht rasch oxydiert wird, zum anderen *Chromatium okenii* durch Sauerstoffeinwirkung getötet wird. — 2. Das Gefäß mußte bei relativ geringer Schichtdicke

der Zellsuspension gut beleuchtbar sein und zur Entnahme einer größeren Anzahl von Proben ein ausreichendes Innenvolumen haben. — 3. Die im Gefäß befindliche Zellsuspension mußte stets homogen verteilt sein, d. h. das Gefäß benötigte eine Rührvorrichtung, die wiederum die Beleuchtbarkeit nicht beeinträchtigen durfte. — 4. Es mußte eine Vorrichtung zu möglichst schneller Probenentnahme von stets gleichen Volumina vorhanden sein, die den Kontakt der Probe mit der Luft möglichst einschränkte und andrerseits keinen toten Raum enthielt, in dem sich unbewegte oder unbeleuchtete Zellsuspension befand. — 5. Das Gefäß mußte ausreichend temperaturkonstant sein.

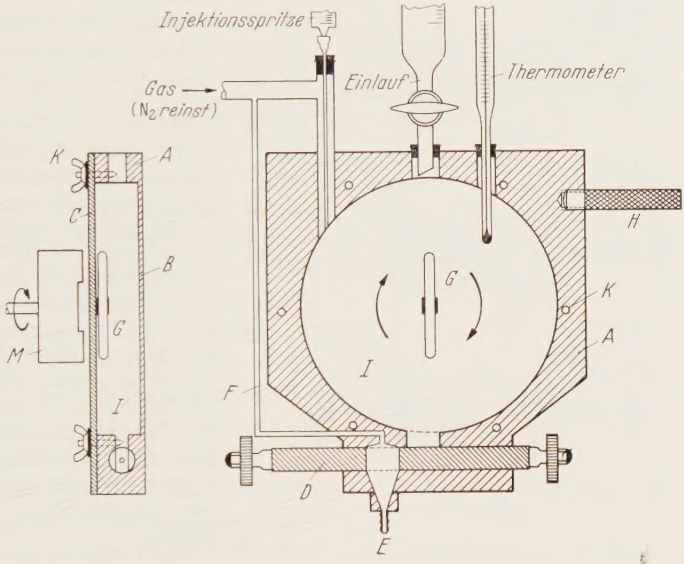

Abb. 1. Rührcuvette. Links seitlicher Schnitt, rechts Schnitt der Vorderansicht. *A* Cuvettenkörper (aus Plexiglas). *B* Vorderwand (2 mm, Plexiglas, nicht abnehmbar). *C* Rückwand (3 mm schwarzes Hostalen, reflexionsarm, abnehmbar, Dichtung durch eingelegten Nylonring. Befestigung an *A* durch Flügelschrauben *K*). *D* Entnahmeschieber (dreh- und schiebbar, ⌀ 14 mm, zylindrisch, enthält eine Langlochbohrung von 1,4 ml Volumen). *E* Auslaufstutzen. *F* Verbindungsrohr bzw. -schlauch (zum Ausdrücken der Probe vermittels des oben anliegenden Gasdruckes). *G* Magnetstab (in Plastik eingegossen). *H* Metallstab (zum Anklemmen der Cuvette an eine Stativhalterung) *I* Innenraum von A (⌀ 120 mm, Tiefe 20 mm). *K* Flügelschrauben zum Befestigen von *C* (Bolzen sind fest in *A* eingelassen). *M* Magnet, durch Elektromotor betrieben

Auf Grund dieser Anforderungen wurde eine Rührcuvette entwickelt (Abb. 1) und von der Phywe A.G., Göttingen, aus Plexiglas hergestellt. Der Entnahmevorgang bei der Anwendung der Rührcuvette ist in Abb. 2 erläutert.

Als Lichtquelle diente eine Philips-Attraluxlampe (60 W), die durch parallele Strahlung eine gleichmäßige Ausleuchtung der Rührcuvette gewährleistete (Abb. 3).

Rührcuvettenversuche wurden nach folgendem Arbeitsschema durchgeführt: Die Zellen aus den Anzuchtflaschen wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 U/min) und zweimal mit frischer CO_2-freier Nährlösung, der 20 μg S^{2-}/ml zugesetzt wurden,

um den gelösten Sauerstoff zu reduzieren, gewaschen. Unterdessen wurde die Cuvette mit Reinststickstoff durchströmt. Die Zellen wurden dann in Nährlösung (CO_2-frei) mit 20 μg S^{2-}/ml und 0,05% Natriumhexametaphosphat, das eine Verklumpung der Zellen wirksam verhinderte (BREUKER 1963), aufgenommen und in die Cuvette gegeben. Nach Einschalten der Magnetrührung (500 U/min) und Abblasen des überstehenden Gases mit Reinststickstoff wurde die Cuvette geschlossen und der in ihr herrschende Druck durch Niveauflaschen konstant gehalten. Nunmehr konnte neutralisierte Sulfidlösung und anschließend die vorgesehene ^{14}C-Hydrogencarbonatlösung injiziert werden. Nach kurzer Dunkelzeit (zur homogenen Durchmischung) wurde die Beleuchtung eingeschaltet und die Probenreihe konnte nach Zeitplan entnommen werden. Die Rührcuvettenversuche wurden im völlig verdunkelten Laboratorium durchgeführt.

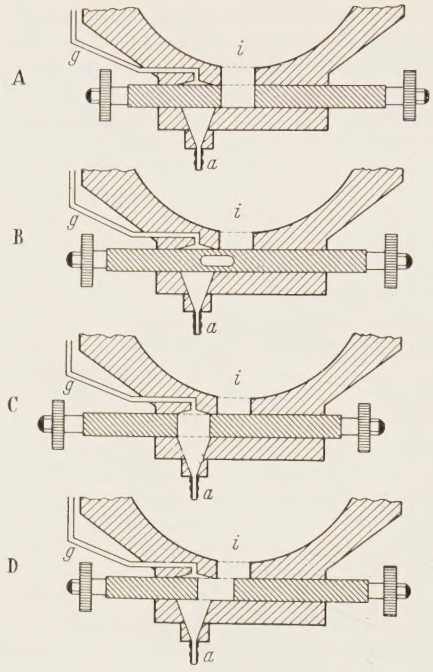

Abb. 2

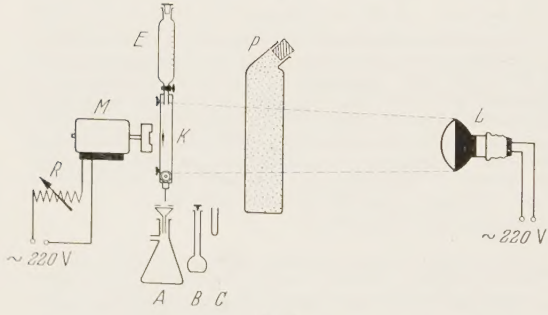

Abb. 3

Die mit Hilfe dieser Technik durchgeführten Versuche hatten im wesentlichen folgende Ergebnisse:

1. Die CO_2-Fixierungsrate ist konstant, d. h. die ^{14}C-Aufnahme in

Abb. 2. Der Entnahmevorgang bei der Rührcuvette. *a* Auslaufstutzen; *g* Gaszuleitung zum Ausdrücken der Probe; *i* Innenraum der Cuvette. A Einlaufstellung. Durch die Magnetrührung wird das in der Bohrung des Schiebers befindliche Gas herausgewirbelt und die Bohrung mit Zellsuspension gefüllt. Der Schieber wird anschließend um 90° gedreht und über Zwischenstellung B nach links geschoben. Über dem Auslauftrichter wird der Schieber durch weitere Drehung um 90° in die Auslaufstellung C gebracht. Der über *g* anliegende Gasdruck preßt die Flüssigkeit ohne Rückstand durch *a* aus, wobei sich die Bohrung im Schieber wieder mit O_2-freiem Gas füllt. D Entnahmestellung für beliebig große Probemengen

Abb. 3. Anordnung der Rührcuvettenversuche. *A, B, C* verschiedene Gefäße zur Probenentnahme; *E* Einlauftrichter; *K* Cuvette; *L* Philips-Attralux-Lampe (60 W). *M* Elektromotor zur Magnetrührung; *P* P-Kolben mit dest. Wasser; *R* Regelwiderstand zur Einstellung der Rührgeschwindigkeit

die Zellen verläuft annähernd linear, da wegen des langsamen Wachstums die Zunahme der Biomasse während eines Versuches von ca. 2 Std Dauer sehr gering ist (vgl. Abb. 4).

2. Die CO_2-Fixierungsrate ändert sich nicht, wenn das exogen angebotene Sulfid verbraucht ist und der intracellulär gespeicherte Schwefel die Rolle des H-Donators übernimmt.

3. Die maximale CO_2-Fixierungsrate liegt im Lichtsättigungsbereich, der bei dieser Versuchsanordnung mit Zellen, die bei 200 Lux kultiviert worden waren, von 2000 Lux an aufwärts erreicht war. Die mittlere maximale CO_2-Fixierungsrate betrug 3,45 μMol CO_2/Std/mg Trockengewicht (nach Abzug des Intracellularschwefels) bzw. 0,069 μMol CO_2/min/mg Protein. Der gefundene Mittelwert liegt somit mehr als eine Zehnerpotenz höher als die von Izawa (1962) an *Rhodopseudomonas palustris* ermittelten Werte von 0,21 μMol CO_2/Std/mg Trockengewicht (mit H_2 als H-Donator) und 0,25 μMol CO_2/Std/mg Trockengewicht (mit Buttersäure als H-Donator).

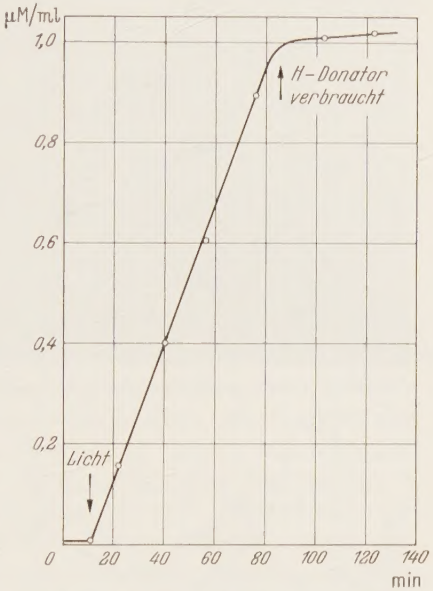

Abb. 4. $^{14}CO_2$-Fixierung im Rührcuvettenversuch. 2000 Lux, 22° C, Zellzahl: $4{,}3 \cdot 10^6$/ml

Um einen Überblick über das CO_2-Fixierungsschema autotroph wachsender Zellen zu erhalten, wurde in Kurzzeit-$^{14}CO_2$-Einbauversuchen in der Rührcuvette die radioaktive Markierung in den einzelnen Intermediärverbindungen nach Äthanolextraktion durch Autoradiographie ermittelt (Abb. 5).

Der Kurzzeiteinbau zeigte, daß nach 8 sec 76,6% der aufgenommenen Radioaktivität in den Phosphatestern lokalisiert war (Abb. 6). Die restliche ^{14}C-Aktivität verteilte sich im wesentlichen auf Aspartat (11%) und eine nicht weiter untersuchte Substanz N_1 (10%), möglicherweise ein Phospholipid, das auch in den Chromatogrammen von Hirsch (1963) und Hirsch et al. (1963) bei Einbauversuchen mit *Chlorella pyrenoidosa* und *Hydrogenomonas* Stamm *H 16* auftrat und dort als X5 bzw. PL3 bezeichnet wurde.

Im weiteren Verlauf des Versuchs fiel die ^{14}C-Aktivität der Phosphatester auf rund 60%, die der Aminosäuren stieg auf 25%. Der Rest der

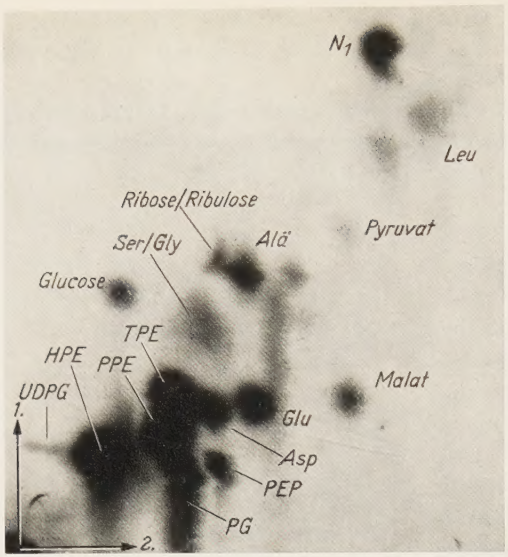

Abb. 5

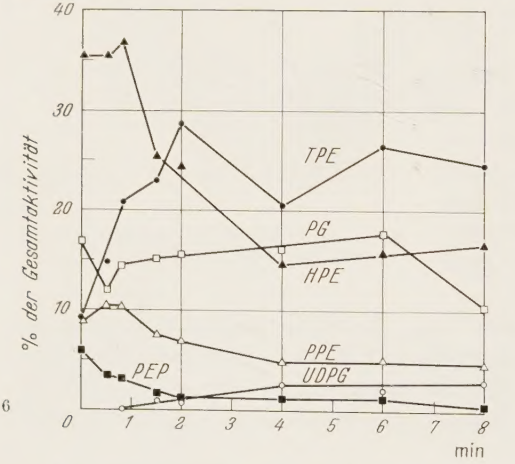

Abb. 6

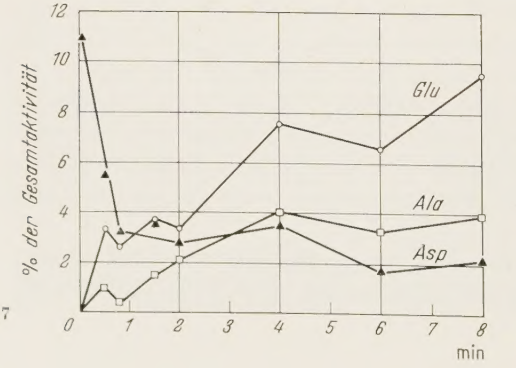

Abb. 7

Radioaktivität verteilte sich hauptsächlich auf Malat, Glucose, Ribose/Ribulose, Pyruvat und andere, schwächer markierte Verbindungen, deren Anteile an der Gesamtaktivität zum Teil unter 1% lagen. Innerhalb der Phosphatester (Abb. 6) lag anfangs die Hauptaktivität in den Hexose/Heptose-Phosphaten, ging aber nach 2 min auf die Triosephosphate über. Die zu Beginn stark abfallende Aktivität im Phosphoglycerat kennzeichnet dieses als Primärprodukt der CO_2-Fixierung; der Abfall der Aktivität im Phosphoenolpyruvat und besonders im Aspartat (Abb. 7) weist auf eine zweite sehr aktive CO_2-Fixierungsreaktion auf dem Wege Phosphoglycerat → Phosphoenolpyruvat → Oxalacetat → Aspartat hin. Die

Abb. 5. Radioautogramm eines $^{14}CO_2$-Einbauversuchs. Inkubationszeit 2 min (Rührcuvette). N_1 nicht identifiziert

Abb. 6. Die radioaktive Markierung in den Phosphatestern (in Prozent der Gesamtradioaktivität des jeweiligen Chromatogramms) im Verlauf eines 8 min-Einbauversuchs. *TPE* Triosephosphate; *HPE* Hexose- und Heptosephosphate; *PPE* Pentosephosphate; *PG* Phosphoglycerat

Abb. 7. Die radioaktive Markierung in den Aminosäuren α-Alanin, Aspartat und Glutamat (in Prozent der Gesamtradioaktivität des jeweiligen Chromatogramms) im Verlauf eines 8 min-Einbauversuchs

in allen Chromatogrammen deutliche Lokalisierung des Pentosephosphat-Flecks spricht stark für das Funktionieren des Pentosephosphatcyclus in *Chromatium okenii*. Überhaupt gleicht das Gesamtbild der CO_2-Fixierung im Radioautogramm weitgehend dem von *Chlorella pyrenoidosa* (Hirsch 1963). Allerdings ist bei *Chromatium okenii* die Markierung in den Aminosäuren stärker. Interessant ist, daß nach 1,5 min Glucose und Uridindiphosphatglucose festzustellen waren, deren Aktivitäten bis zur 8. min auf 2% bzw. 2,8% anstiegen. Das dürfte die Anwesenheit eines Uridindiphosphatglucose-Pyrophosphorylasesystems bei der Polysaccharidsynthese sehr wahrscheinlich machen. Der starke Abfall der Aktivität in den Hexosephosphaten nach der 1. min wird ebenfalls eine Folge der Polysaccharidspeicherung sein.

B. Enzymologische Untersuchungen an zellfreien Extrakten

I. Photosynthesecyclus und Polysaccharidsynthese

Die Autotrophie von Mikroorganismen ist im wesentlichen durch das Vorhandensein der Enzyme Phosphoribulokinase und Ribulosediphosphat-Carboxylase charakterisiert (Elsden 1962; Vishniac u. Trudinger 1962). Es sind dies die Schlüsselenzyme des Photosynthese- bzw. Pentosephosphatcyclus, dessen Vorkommen in *Chromatium okenii* durch das Markierungsschema in den Kurzzeitversuchen bereits wahrscheinlich gemacht war. Die Bestimmung der Ribulosediphosphat-Carboxylase in zellfreien Extrakten im $^{14}CO_2$-Fixierungstest nach Peterkofsky u. Racker (1961) modifiziert nach Gottschalk (1964) ergab eine mittlere spezifische Aktivität von 20 μMol CO_2/min/g Protein = 20 Milli-Einheiten (mE). Dieser Wert liegt für Photosynthesebakterien im Normalbereich. Fuller et al. (1961) fanden für *Chromatium* Stamm *D* 138 mE, Smillie et al. (1962) für *Chlorobium thiosulphatophilum* Stamm *L* 12 mE. Aus den Ergebnissen von Lascelles (1960) erhält man nach Umrechnung für *Rhodopseudomonas palustris* und *Rhodopseudomonas spheroides* Werte im Bereich von 15–30 mE. Bei diesen Vergleichen sind allerdings die unterschiedlichen Wachstumsraten der Organismen sowie Temperaturen und Beleuchtungsstärken bei der Anzucht zu berücksichtigen. Auch die Ribulosediphosphat-Carboxylase-Aktivität chemolithotroph wachsender Bakterien liegt in diesem Bereich; so fand Gottschalk (1964) für *Hydrogenomonas* Stamm *H 16* eine mittlere spezifische Aktivität von 40 mE (maximal 55 mE).

Die bei *Chromatium okenii* gefundene Ribulosediphosphat-Carboxylase-Aktivität von 0,02 μMol CO_2/min/mg Protein beträgt rund 30% der CO_2-Fixierungsrate ganzer Zellen.

Die Anwesenheit der Phosphoribulokinase wurde durch Testen des Systems Phosphoriboisomerase/Phosphoribulokinase nachgewiesen. Dabei wurde nach Racker (1957) mit Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydro-

Tabelle 1. *Spezifische Aktivitäten von Enzymen des Photosynthesecyclus und des Kohlenhydratstoffwechsels in zellfreien Extrakten aus Chromatium okenii nach Anzucht mit CO_2 als einziger C-Quelle*

Die angegebenen Aktivitäten stellen Mittelwerte aus Bestimmungen an mehreren Rohextrakten nach gleicher Anzucht dar. Enzymnomenklatur (E.C.) nach "Report of the Commission on Enzymes" 1961, Oxford, London, New York, Paris, Pergamon Press

E.C.Nr.	Enzym	Spez. Akt. (mE)
—	Ribulosediphosphat-Carboxylase	20
2.7.1.19.	Phosphoribulokinase/Phosphoriboisomerase	4000
2.7.2.3.	3-Phosphoglycerat-Kinase	1430
1.2.1.12.	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (NAD)	277
1.2.1.13.	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (NADP)	0
5.3.1.1.	Triosephosphat-Isomerase	850
4.1.2.7.	Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase	11
3.1.3.11.	Fructose-1,6-diphosphatase (alkal.)	716
5.3.1.9.	Phosphoglucose-Isomerase	560
2.7.5.1.	Phosphoglucomutase	9
4.1.2.7.	Fructose-1-phosphat-Aldolase	0
2.7.1.1.	Hexokinase	18
1.1.1.49.	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0
2.7.5.3.	Phosphoglycerat-Mutase	30
4.2.1.11.	Enolase	240
2.7.1.40.	Pyruvat-Kinase	11

genase gekoppelt. Es zeigte sich, daß das getestete System mit hoher spezifischer Aktivität — rund 4000 mE — vorhanden war. Dieser Wert entspricht dem von *Chromatium* Stamm *D* (FULLER et al. 1961).

Das von *Chromatium* Stamm *D* gebildete Polysaccharid, welches ursprünglich als Galaktosepolymer angesehen wurde (NEWTON u. NEWTON 1958), konnte kürzlich von ARNON et al. (1963) als Glucosepolymer identifiziert werden. Wie BOHLKEN (persönliche Mitteilung) und KRAN (1964) nachwiesen, ist auch das von *Chromatium okenii* gebildete Polysaccharid eine Polyglucose. Bei *Chromatium* Stamm *D* erfolgt die Synthese des Polysaccharids über die Reaktionen des Embden-Meyerhof-Weges (FULLER et al. 1961). Mit Hilfe entsprechender Enzymtests ließ sich nachweisen, daß der gleiche Weg auch bei *Chromatium okenii* vorliegt (Tab.1). Die ersten sieben der in Tab.1 aufgeführten Enzyme stellen gleichzeitig wichtige Schritte im Photosynthesecyclus dar (BASSHAM et al. 1954; SMILLIE 1960). Obwohl in höheren Pflanzen und Grünalgen sowohl NAD- als auch NADP-abhängige Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase vorkommt, liegt in *Chromatium okenii* nur das NAD-gebundene Enzym vor. Dies ist auch der Fall bei *Chromatium* Stamm *D* und *Chlorobium thiosulphatophilum* sowie den *Athiorhodaceae Rhodopseudomonas spheroides* und *Rhodomicrobium vannielii* (SMILLIE u. FULLER 1960).

Bei der Untersuchung der Aldolase konnte beobachtet werden, daß die Enzymaktivität bereits durch zwölfstündige Lagerung des Rohextraktes bei $-20°$ C um rund 50% abnahm. Möglicherweise handelt es sich bei der Aldolase in *Chromatium okenii* um ein kälteempfindliches Enzym ähnlich der von Shuster u. Doudoroff (1962) beschriebenen β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase aus *Rhodospirillum rubrum*.

Als weitere am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligte Enzyme wurden Fructose-1-phosphat-Aldolase, Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase getestet (Tab. 1). Da *Chromatium okenii* nach Kran (1964) offenbar Glucose nicht als Substrat verwerten kann, ist das Vorhandensein einer Hexokinaseaktivität unerklärlich. Auch bei *Hydrogenomonas* Stamm *H 16* fand Gottschalk (1964) eine aktive Hexokinase, obgleich der Organismus nicht in der Lage war, mit Glucose zu wachsen. Das Fehlen von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Extrakten aus *Chromatium okenii* — das einwandfreie Funktionieren des Enzymtests wurde mit Extrakten aus *Hydrogenomonas* Stamm *H 16* sichergestellt — spricht dafür, daß der Abbau der gespeicherten Polysaccharide und ihre Einschleusung in den Intermediärstoffwechsel auf dem Glykolyseweg (Embden-Meyerhof-Schema) und nicht über den Hexosemonophosphat-Shunt oder den Entner-Doudoroff-Weg erfolgt.

II. Die CO_2-Fixierung an C_3-Verbindungen

Die auf dem Wege vom Phosphoglycerat als Primärprodukt der photosynthetischen CO_2-Fixierung zum Pyruvat als Zentrum des Intermediärstoffwechsels zu durchlaufenden Enzymschritte wurden ebenfalls getestet (Tab. 1). Wie oben bereits erwähnt wurde, mußte die in den Radioautogrammen beobachtete frühzeitige Markierung im Aspartat die Folge einer zweiten Hauptfixierungsreaktion sein, und zwar einer Carboxylierung von Pyruvat oder Phosphoenolpyruvat.

Nach den über derartige Carboxylierungen gegenwärtig vorliegenden Erkenntnissen (zusammenfassend dargestellt bei Schlegel 1963 sowie Wood u. Stjernholm 1962) waren theoretisch sechs Reaktionen denkbar:

1. Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (E.C.4.1.1.31.):
   $PEP + CO_2 + H_2O \rightarrow OAC + P_a$
2. Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (E.C.4.1.1.32.):
   $PEP + CO_2 + IDP \rightleftharpoons OAC + ITP$ (bzw. ADP/ATP)
3. Phosphoenolpyruvat-Carboxytransphosphorylase:
   $PEP + CO_2 + P_a \rightleftharpoons OAC + PP_a$
4. Pyruvat-Carboxylase (E.C.6.4.1.1.), Acetyl-CoA-abhängig:
   $Pyruvat + CO_2 + ATP \rightarrow OAC + ADP + P_a$
5. Pyruvat-Carboxylase (E.C.6.4.1.1.), Acetyl-CoA-unabhängig:
   $Pyruvat + CO_2 + ATP \rightarrow OAC + ADP + P_a$
6. Malic enzyme (E.C.1.1.1.40.):
   $Pyruvat + CO_2 + NADPH_2 \rightleftharpoons Malat + NADP$

Eine von SUZUKI u. WERKMAN (1958) angegebene Methode zur Bestimmung von Phosphoenolpyruvat-Carboxylase und -Carboxykinase, die auf der Umwandlung des gebildeten Oxalacetats in das entsprechende 2,4-Dinitrophenylhydrazon beruht, wurde so ausgearbeitet, daß sie zur differentiellen Bestimmung der ersten fünf der oben angeführten Enzyme

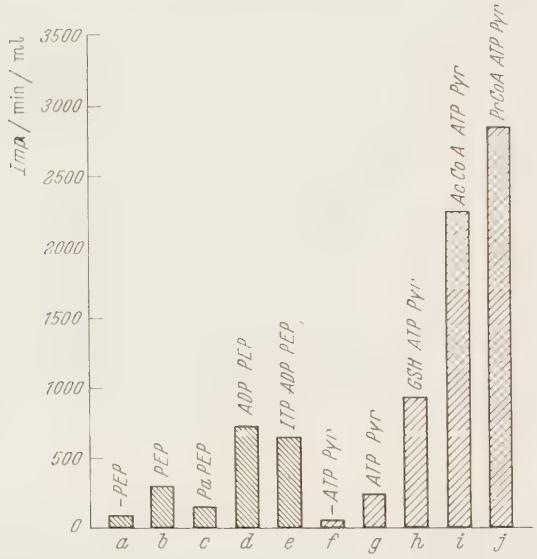

Abb. 8. Die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat und Pyruvat in zellfreien Extrakten von *Chromatium okenii*. Alle Proben enthielten: 0,35 ml 0,1 m Tris-Puffer pH 7,4; 0,05 ml 0,1 m $MgCl_2$; 0,10 ml 0,3 m $NaH^{14}CO_3$ (28300 Imp/min/μMol); 0,2 ml Rohextrakt (15,04 mg Protein/ml). Proben *a*—*e* enthielten zudem: 0,10 ml 0,1 m GSH neutralisiert. Die angegebenen Zusätze waren: AcCoA (0,01 ml 0,01 m Acetyl-CoA), ADP, ATP und ITP (0,10 ml, 10 mg/ml), GSH (0,10 ml 0,1 m, neutralisiert), P_i (0,10 ml 2 m K-Phosphat, pH 7,4), PEP (0,10 ml 0,1m), PrCoA (0,01 ml 0,01 m Propionyl-CoA), Pyr (0,10 ml 0,1 m Na-Pyruvat). Alle Proben wurden mit Wasser auf 1,0 ml aufgefüllt. Inkubation unter N_2 15 min bei 31° C. Bestimmung der fixierten Radioaktivität im Oxalacetat-2,4-Dinitrophenylhydrazon

verwendet werden konnte. Das Ergebnis zeigt Abb. 8, aus der zu ersehen ist, daß in den Extrakten nur zwei der in Frage kommenden Enzyme vorliegen, nämlich Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Pyruvat-Carboxylase (Acetyl-CoA-abhängig). Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase funktioniert offenbar mit ADP und IDP (Abb. 8, d und e). Die Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxytransphosphorylase, -Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase (Acetyl-CoA-unabhängig) waren in den Extrakten nicht vorhanden (Abb. 8, c, b und g). Abb. 8, h—j weist eindeutig auf die Acetyl- oder Propionyl-CoA-abhängige Pyruvat-Carboxylase nach UTTER u. KEECH (1960, 1963) hin, ein SH-Gruppenenzym. Der gegenüber Propionyl-CoA geringere Wert mit Acetyl-CoA stimmt mit den Befunden von KEECH u. UTTER (1963) überein. Theoretisch wäre die

katalytische Wirkung der CoA-Verbindungen mit ihrer Carboxylierung zu Malonyl- bzw. Methylmalonyl-CoA und anschließender Transcarboxylierung auf Pyruvat erklärbar. Diese Reaktionen spielen im Stoffwechsel der Propionibakterien eine zentrale Rolle (Wood et al. 1963). Für *Chromatium okenii* wäre dann eine Acetyl-CoA- bzw. Pro-

Tabelle 2. *Hemmbarkeit der Pyruvat-Carboxylase durch Avidin*
Kompletter Ansatz siehe Methoden

	Ansatz	CO_2fix. Imp/min/Ansatz	Aktivität %	Hemmung %
A	Kompletter Ansatz	672	100	—
B	+ 0,05 ml Avidin (25 Einh./ml)	444	66	34
C	+ 0,05 ml Avidin (25 Einh./ml) · 0,05 ml Biotin (100 μMol/ml)	456	68	32

pionyl-CoA-Carboxylase (E.C.6.4.1.2. bzw. E.C.6.4.1.3.) zu postulieren. Beide Enzyme waren jedoch mit CO_2-Fixierungstests nach Tietz u. Ochoa (1962) nicht nachweisbar. Zudem konnte nach der gleichen Methode keine Fixierung in der Proteinfraktion, die auf einen Enzym-CO_2-Komplex als Intermediärprodukt hingewiesen hätte, gefunden werden. In *Chlorobium thiosulphatophilum* und *Rhodospirillum rubrum* ist Propionyl-CoA-Carboxylase nach Anzucht mit Propionat nachgewiesen worden (Larsen 1951; Knight 1962). Da Kran (1964) feststellen konnte, daß *Chromatium okenii* neben anderen organischen Säuren auch Propionat zur Polysaccharidsynthese verwerten kann, andrerseits in der vorliegenden Arbeit mit rein autotroph gezogenen Zellen gearbeitet wurde, muß angenommen werden, daß Propionyl-CoA-Carboxylase induktiv gebildet werden kann.

Mit der modifizierten Methode nach Suzuki u. Werkman (1958) wurde die Kinetik der Pyruvat-Carboxylase aufgenommen (Abb. 9 *A*). Für ihre spezifische Aktivität ergab sich ein Wert von 6,05 mE. Wie Abb. 9 *A* zeigt, läßt die Aktivität des Enzyms nach der 15. min erheblich nach, was durch die begrenzt vorhandenen Substrate bzw. Cofaktoren und ein teilweises Abreagieren des Acetyl-CoA über das citratkondensierende Enzym (condensing enzyme) bewirkt wird. Die Pyruvat-Carboxylase erwies sich in Übereinstimmung mit den Befunden von Utter u. Keech (1963) als hemmbar durch Avidin (Tab. 2), eine nennenswerte Aufhebung der Avidinhemmung durch Biotin war nicht demonstrierbar.

Die Kinetik der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wurde an Hand des $^{14}CO_2$-Austausches im Oxalacetat ebenfalls nach Suzuki u. Werkman

(1958) aufgenommen (Abb. 9 *B*). Die Zunahme der Radioaktivität im Oxalacetat verläuft linear. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms nach dieser Methode ergab 1,8 mE bei Einsatz von ITP als Cosubstrat. Eine Parallelbestimmung nach der Methode von UTTER u. KURAHASHI (1955) hatte die in Tab. 3 aufgeführten Ergebnisse. Die höhere Affinität des Enzyms für ATP im Vergleich zu ITP wird darin deutlich. Nach CANNATA u. STOPPANI (1959) ist das Enzym in Hefe ebenfalls ATP-abhängig. Da bei dieser Methode (Tab. 3) die eventuelle Markierung im Aspartat beim Auszählen der Radioaktivität der Proben miterfaßt wird, andrerseits die Werte der spezifischen Aktivität mit ITP als Cosubstrat von denen aus der Bestimmung nach SUZUKI u. WERKMAN (1958) nicht wesentlich abweichen, kann man auch die nach letzterer Methode erhaltenen Werte für Pyruvat-Carboxylase als hinreichend genau ansehen.

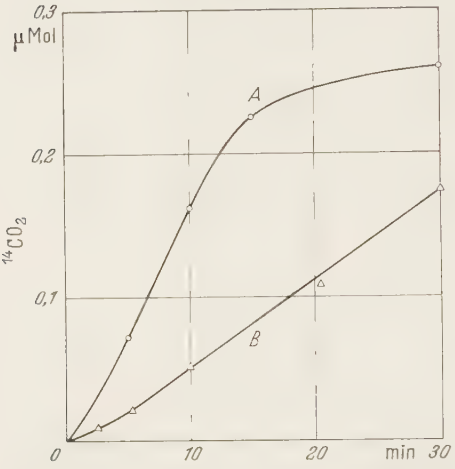

Abb. 9. *A* Kinetik der Acetyl-CoA-abhängigen Pyruvat-Carboxylase, Ansatz siehe Methoden (Rohextrakt: 15,04 mg Protein/ml). *B* Kinetik der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; Ansatz siehe Methoden, vierfach (2,0 ml Rohextrakt, 12,75 mg Protein/ml)

Tabelle 3. *Bestimmung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase nach Utter u. Kurahashi (1955) im zellfreien Extrakt von Chromatium okenii*
Kompletter Ansatz siehe Methoden. Rohextrakt: 12,75 mg Protein/ml

	Ansatz	CO_2 fix Imp/min/Ansatz	Spez. Aktivität mE
A	Kompletter Ansatz (0,1 ml Rohextrakt)	230	1,01
B	Kompletter Ansatz (0,2 ml Rohextrakt)	594	1,3
C	— ITP	30	—
D	— ITP, + 0.1 ml ATP	979	4.3
E	— Oxalacetat	10	—

Zur Bestimmung des malic enzyme wurde der auch von FULLER u. KORNBERG (1961) bei *Chromatium* Stamm *D* verwendete spektrophotometrische Testansatz nach OCHOA (1955a) angewandt. Dabei wird der Anstieg der $NADPH_2$-Extinktion im Verlauf der Malatspaltung bestimmt. Die Untersuchungen ergaben, daß *Chromatium okenii* nach Anzucht auf CO_2 als einziger C-Quelle über keinerlei malic enzyme-Aktivität verfügt. Im Bereich von Proteinkonzentrationen zwischen 0.1

und 2,5 mg im 3 ml-Ansatz konnte keine NADP-Reduktion festgestellt werden. Extrakte aus *Chromatium okenii*, das bei 1000 Lux mit Acetat als zweiter C-Quelle gewachsen war, sowie Chromatophorensuspensionen wiesen ebenfalls keine malic enzyme-Aktivität auf. Vergleichsweise wurde ein aus Taubenleber-Acetontrockenpulver gewonnener wäßriger Extrakt zugesetzt, der die in der Originalvorschrift (Ochoa 1955a) angegebene Aktivität zeigte. Extrakte aus *Mycobacterium* Stamm *IBS-M* (Lafferty 1963) enthielten ebenfalls malic enzyme, so daß das einwandfreie Funktionieren des Tests gesichert war.

III. Enzyme des Tricarbonsäure- und Glyoxylatcyclus

Die von Kran (1964) beobachtete Verwertung von Succinat zur Bildung von Polysacchariden durch *Chromatium okenii* im Licht (mit CO_2 und Sulfid im Medium) setzt u. a. das Vorhandensein der Enzyme Succinat-Dehydrogenase und Fumarase voraus. In den Kurzzeit-$^{14}CO_2$-Fixierungsversuchen konnte ferner nach 30 sec Markierung in Malat und Succinat, nach 1 min in Glyoxylat und nach 4 min in Citrat beobachtet werden.

Tabelle 4

Spezifische Aktivitäten von Enzymen des Tricarbonsäure- und Glyoxylatcyclus in zellfreien Extrakten aus Chromatium okenii nach Anzucht mit CO_2 als einziger C-Quelle

Die angegebenen Aktivitäten stellen Mittelwerte aus Bestimmungen an mehreren Rohextrakten nach gleicher Anzucht dar

E. C. Nr.	Enzym	Spez. Akt. (mE)
4.1.3.7.	Condensing enzyme	19
4.2.1.3.	Aconitase	> 7,1
1.1.1.42.	Isocitrat-Dehydrogenase (NADP)	7,1
1.1.1.43.	Isocitrat-Dehydrogenase (NAD)	0
1.2.4.2.	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase	0
1.1.1.37.	Malat-Dehydrogenase	24
4.1.3.1.	Isocitratase	1,8
4.1.3.2.	Malat-Synthetase	8,7

Fuller et al. (1961) entdeckten, daß *Chromatium* Stamm *D* keinen vollständigen Tricarbonsäurecyclus besitzt; es fehlen α-Ketoglutarat-Dehydrogenase und, wie Fuller u. Kornberg (1961) zeigen konnten, Malat-Dehydrogenase. Letztere wird durch eine Kombination von malic enzyme und Pyruvat-Carboxylase ersetzt. Der eigentliche Cyclus ist dann ein modifizierter Glyoxylatcyclus. Die *Athiorhodaceae*, die zum Teil zu einem oxydativen Stoffwechsel im Dunkeln befähigt sind, verfügen hingegen über den kompletten Tricarbonsäurecyclus (Eisenberg 1953; Stoppani et al. 1955; Elsden u. Ormerod 1956; Crook u. Lindstrom 1956), der auch im anaeroben Lichtstoffwechsel funktioniert (Gest et al. 1962).

Die Untersuchung der Enzyme des Tricarbonsäure- und Glyoxylatcyclus in zellfreien Extrakten von *Chromatium okenii* hatte die in Tab. 4 aufgeführten Ergebnisse. Danach besitzt *Chromatium okenii* einen normalen Glyoxylatcyclus. Es gelang nicht, mit Hilfe der spektrophotometrischen Methode nach KAUFMAN (1955) irgendeine Oxydation von α-Ketoglutarat durch NAD oder NADP in zellfreien Extrakten von *Chromatium okenii* nachzuweisen. Auch frisch hergestellte, im Rohextrakt direkt aufgeschwemmte Chromatophorensuspensionen waren nicht zur Katalyse einer derartigen Reaktion befähigt. Da das einwandfreie Funktionieren des Testansatzes mit zellfreien Extrakten aus *Hydrogenomonas* Stamm *H 16* und *Mycobacterium* Stamm *IBS-M* (LAFFERTY 1963) gesichert werden konnte, muß angenommen werden, daß *Chromatium okenii* nicht über ein NAD- oder NADP-abhängiges α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-System verfügt. Interessant ist, daß eine recht aktive Malat-Dehydrogenase vorhanden ist. Hier unterscheidet sich *Chromatium okenii* wesentlich von *Chromatium* Stamm *D*. Das Vorhandensein dieses Enzyms in *Chromatium okenii* läßt das Fehlen des malic enzyme somit als sinnvoll erscheinen. Die Malat-Dehydrogenase zeigte mit $NADPH_2$ unter 10% der mit $NADH_2$ entwickelten Aktivität. Eine Bestimmung der Malat-Dehydrogenaseaktivität in Extrakten aus Zellen, die bei 1000 Lux mit Acetat als zweiter C-Quelle gewachsen waren, ergab eine rund zehnfach höhere spezifische Aktivität. Zur Absicherung dieser Befunde wurden parallel Lactat-Dehydrogenasetests durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die vorhandene Lactat-Dehydrogenaseaktivität nahezu unmeßbar klein war und somit den Malat-Dehydrogenasetest nicht durch Reduktion von Pyruvatspuren beeinflussen konnte.

IV. Die Bildung von Acetyl-CoA

Das Funktionieren des Tricarbonsäure- oder Glyoxylatcyclus erfordert die ständige Nachlieferung von Acetyl-CoA. Dieses wird normalerweise aus Pyruvat durch oxydative Decarboxylierung oder aus exogenem freien Acetat durch Aktivierung synthetisiert. Ein von SCHINDLER (1964) entwickelter Testansatz zur Untersuchung der Decarboxylierung des Pyruvats beruht auf der Übertragung des gebildeten Acetyl-CoA auf p-Nitroanilin durch eine aus Taubenleber angereicherte Arylamin-Transacetylase. Die Anwendung dieser Methode auf Rohextrakte von *Chromatium okenii* ergab, daß Acetyl-CoA nur gebildet wurde, wenn dem Testansatz zusätzlich ATP beigefügt wurde. Außerdem war die Reaktion unabhängig von NAD und NADP (Tab. 5). Da die Bildung von Acetyl-CoA aus Acetat schneller erfolgte als aus Pyruvat (Tab. 5), muß angenommen werden, daß die Acetyl-CoA-Bildung aus Pyruvat über das freie Acetat erfolgt, wobei die Acetatbildung aus

Tabelle 5. *Untersuchung der Acetyl-CoA-Bildung durch zellfreie Extrakte aus Chromatium okenii nach Schindler (1964)*

Rohextrakt: 11,6 mg Protein/ml. Zusätze: ATP (0,10 ml 10 mg/ml), Na-Acetat (0,20 ml 0,1 m). Das einwandfreie Funktionieren des Tests wurde mit *Hydrogenomonas*-Extrakten gesichert

Ansatz	Δ Extinktion/min
1. Kompletter Ansatz (0,1 ml Rohextrakt)	0,007
2. NADP statt NAD	0,007
3. + ATP	0,025
4. + ATP, — NAD, — TPP	0,025
5. + ATP, + Acetat, — Pyruvat, — NAD, — TPP	0,040
6. + ATP, + Acetat, — Pyruvat	0,040

Pyruvat begrenzend ist. Dabei könnte man einen von Holzer u. Goedde (1957) postulierten Reaktionsweg zugrunde legen:

$$\text{Pyruvat} \xrightarrow{\text{TPP}} \text{2-}(\alpha\text{-Hydroxy-}\alpha\text{-carboxyäthyl)-TPP} \xrightarrow{-CO_2}$$

$$\text{2-}(\alpha\text{-Hydroxyäthyl)-TPP} \xrightarrow{-2H} \text{2-Acetyl-TPP} \xrightarrow{+H_2O} \text{Acetat}$$

Dieser Weg wurde formuliert, als Holzer u. Goedde (1957) beobachtet hatten, daß Pyruvat an gereinigter Pyruvat-Dehydrogenase aus Hefe in einer streng TPP-abhängigen Reaktion durch Dichlorphenolindophenol in stöchiometrischen Mengenverhältnissen zu Acetat oxydiert wird. Über die Natur der Dehydrierung des 2-(α-Hydroxyäthyl)-TPP (aktiver Acetaldehyd) zu Acetyl-TPP in *Chromatium okenii*-Extrakten kann auf Grund der durchgeführten Versuche noch keine Aussage gemacht werden. Über die Pyruvatspaltung bei *Chromatium* Stamm *D* ist nichts Näheres bekannt (Losada et al. 1961). Die beobachtete Acetataktivierung zu Acetyl-CoA (Tab. 5) wurde durch Bildung der Acethydroxamsäure nach Rose (1955) bestätigt. Die mittlere spezifische Aktivität des Acetat-aktivierenden Systems in Rohextrakten aus *Chromatium okenii* betrug 150 mE. Ob die Aktivierung des Acetats über Acetat-Thiokinase (E.C.6.2.1.1.) (Berg 1956), wie bei *Rhodospirillum rubrum* (Eisenberg 1953) und *Euglena gracilis* (Ohmann 1963), oder über Acetat-Kinase (E.C.2.7.2.1.) und Phosphotransacetylase (E.C.2.3.1.8.), wie bei vielen Bakterien, nicht aber im Säugetier (Rose 1955), erfolgt, kann nur durch Anreicherung des Enzymsystems aus dem Rohextrakt geklärt werden.

V. Alkohol-Dehydrogenase

Versuche, in zellfreien Extrakten von *Chromatium okenii* nach Wachstum mit CO_2 als einziger C-Quelle eine aktive Alkohol-Dehydrogenase (E.C.1.1.1.1.) nachzuweisen, verliefen negativ. Methodische Fehler wurden durch positive Vergleichstests an Hefeextrakten ausgeschlossen. Pfennig (persönliche Mitteilung) und Kran (1964) hatten

beobachtet, daß *Chromatium okenii* Äthanol nicht verwerten kann. Die Befunde stehen also miteinander im Einklang.

VI. Synthese von α-Alanin, Aspartat und Glutamat

Innerhalb des Aminosäurestoffwechsels nehmen Aspartat, Glutamat und α-Alanin zentrale Stellungen ein. Sie werden auf kürzestem Wege aus dem Pool der organischen Säuren synthetisiert. Die Einführung der Aminogruppe erfolgt durch Transaminierung, reduktive oder saturative Aminierung.

Die wichtigsten Transaminasen in zellfreien Extrakten von *Chromatium okenii* wurden qualitativ mit Hilfe einer modifizierten Methode nach SMITH (1963) untersucht. Dabei wurde eine α-Ketosäure als Acceptor mit einer Aminosäure als Donator der NH_2-Gruppe sowie mit Pyridoxalphosphat und Rohextrakt inkubiert. Anschließend wurde abgetötet, abzentrifugiert und das Überstehende durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Es ergab sich, daß folgende Reaktionen katalysiert werden konnten:

Glutamat + Oxalacetat → Aspartat + α-Ketoglutarat
Aspartat + α-Ketoglutarat → Glutamat + Oxalacetat
Glutamat + Pyruvat → α-Alanin + α-Ketoglutarat

α-Alanin wirkte als NH_2-Donator weder gegenüber Oxalacetat, noch gegenüber α-Ketoglutarat. Pyruvat konnte durch Aspartat nicht aminiert werden. Innerhalb der drei untersuchten Aminosäuren nimmt somit Glutamat die Zentralstellung ein. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als in den $^{14}CO_2$-Einbauversuchen (Abb. 7) die Markierung im Alanin den Schwankungen der Markierung im Glutamat weitgehend folgt, so daß man annehmen kann, daß Glutamat auch in vivo den NH_2-Donator für die α-Alaninsynthese aus Pyruvat darstellt.

Versuche, nach der gleichen Methodik eine direkte Aminierung nachzuweisen, indem als Donator NH_4Cl und als Acceptor Fumarat, Mesaconat, Itaconat oder α-Ketoglutarat eingesetzt wurde, ergaben nur im letzteren Falle einen leichten Glutamatfleck, und zwar unabhängig davon, ob $NADH_2$ zugesetzt wurde oder nicht.

Als Enzyme der reduktiven Aminierung wurden in optischen Tests nach WIAME et al. (1962) α-Alanin-Dehydrogenase (E.C.1.4.1.1.) und Glycin-Dehydrogenase, nach STRECKER (1955) Glutamat-Dehydrogenase (E.C.1.4.1.4.) untersucht. Keines der drei Enzyme war in Extrakten von Zellen, die bei 200—250 Lux mit CO_2 als einziger C-Quelle gewachsen waren, nachzuweisen. Dabei wurde das einwandfreie Funktionieren der Testansätze mit Extrakten aus *Mycobacterium* Stamm *IBS-M* (LAFFERTY 1963) bzw. reiner Glutamat-Dehydrogenase aus Schweineherz (Boehringer) gesichert. Eine probeweise Bestimmung der Glutamat-

Dehydrogenase in Extrakten aus Zellen, die bei 1000 Lux mit Acetat als zweiter C-Quelle gewachsen waren, ergab mit $NADH_2$ eine spezifische Aktivität von 163 mE.

VII. Zur Frage der Glutamatsynthese über Citramalat

Gray u. Kornberg (1960) entdeckten in Extrakten aus *Pseudomonas ovalis* eine Kondensationsreaktion zwischen Acetyl-CoA und Pyruvat. Das katalysierende Enzym nannten sie Pyruvat-Transacetase. Es synthetisiert das von Barker (1956) als Zwischenprodukt des Glutamatabbaus durch *Clostridium tetanomorphum* gefundene Citramalat (2-Hydroxy-2-methylsuccinat). In zellfreien Extrakten von *Chromatium* Stamm *D* hatten Losada et al. (1960) die Bildung von markiertem Citramalat, Glutamat und Itaconat festgestellt, wenn mit ^{14}C-Acetat, ATP, Mg^{2+} und nichtmarkiertem Pyruvat inkubiert wurde. Sie glauben daher annehmen zu können, daß der Glutamatabbauweg von *Clostridium tetanomorphum* in *Chromatium* Stamm *D* in umgekehrter Richtung über Itaconat als Aufbauweg vorliegt. Fuller et al. (1961) konnten allerdings bei Extrakten von *Chromatium* Stamm *D*, das auf Acetat gewachsen war, mit Hilfe von Inkubationsversuchen mit 2-^{14}C-Acetat und Pyruvat lediglich eine Markierung im Acetyl-CoA nachweisen, wodurch die Befunde von Losada et al. (1960) in Zweifel gestellt sind.

Zur Bestimmung der Pyruvat-Transacetase in Extrakten aus *Chromatium okenii* wurde der Malat-Synthetase-Test nach Dixon u. Kornberg (1959) mit der Abwandlung benutzt, daß statt Glyoxylat Pyruvat als Substrat eingesetzt wurde. Pyruvat-Transacetase war mit einer spezifischen Aktivität von 93,3 mE vorhanden. Da im Test kein ATP eingesetzt wurde, das eventuell eine Carboxylierung von Pyruvat mit dem CO_2 der Luft zu Oxalacetat bewirkt hätte, welches wiederum über das condensing enzyme Acetyl-CoA verbraucht hätte, muß die Bestimmung als exakt angesehen werden. — Die Möglichkeit einer Glutamatsynthese über Citramalat schien somit nicht ausgeschlossen. Unter Einsatz von Glutamat-Dehydrogenase als Hilfsenzym in einem optischen Test wurde nunmehr versucht, die mögliche Funktion von Mesaconat, seinem Isomeren Itaconat sowie β-Methylaspartat als Glutamatvorläufer nachzuweisen. Da mit keinem der drei Substrate eine Glutamatbildung festzustellen war, verfügt *Chromatium okenii* (nach Wachstum mit Acetat und CO_2) offenbar nicht über Enzymsysteme, die (unter den angewandten Versuchsbedingungen) den Aufbau von Glutamat aus Mesaconat oder Itaconat über β-Methylaspartat zu katalysieren vermögen. Das Ergebnis schließt die Bildung von Glutamat aus Citramalat über einen anderen, unbekannten Weg nicht aus. Obwohl auch in *Rhodospirillum rubrum* bei Wachstum auf Acetat und CO_2 die Bildung von Citramalat nachgewiesen wurde (Benedict 1962), ist die Synthese des

Glutamats nach dem Barkerschen Schema, wie HOARE (1962a, 1962b, 1963) durch Markierungsversuche und Abbau des Glutamats nachgewiesen hat, ausgeschlossen. Überraschenderweise schließen HOARES Befunde die Bildung des Glutamats über den Tricarbonsäurecyclus ebenfalls aus. Somit ist zumindest für *Rhodospirillum rubrum* ein bisher unbekannter Syntheseweg anzunehmen. Ob dieser Weg auch für *Chromatium okenii* in Frage kommt, bleibt zu untersuchen. Gegen diese Möglichkeit spricht, daß die Markierungskurve des Glutamats in den Kurzzeit-Einbauversuchen (Abb. 7) mit einem Anstieg beginnt, während sie bei vergleichbaren Versuchen mit *Rhodospirillum rubrum* (HOARE 1963) abfällt.

Diskussion

Auf Grund der durchgeführten enzymologischen Untersuchungen sowie der Kurzzeit-CO_2-Fixierungsversuche ergibt sich für den C-Stoffwechsel von *Chromatium okenii* Stamm *Ostrau* nunmehr folgendes Bild (Abb. 10): Der Organismus verfügt zwar wie *Chromatium* Stamm *D* über alle Enzyme, die zur Synthese eines Glucose-Polysaccharids durch photosynthetische CO_2-Fixierung notwendig sind, doch wird $^{14}CO_2$ in weit höherem Maße in die Zuckerphosphate eingebaut als bei Stamm *D*. Der in Stamm *D* zur Proteinsynthese abgezweigte Anteil an markiertem Phosphoglycerat ist zu Anfang etwa viermal größer als in *Chromatium okenii*, was mit der bei Stamm *D* wesentlich höheren Wachstumsrate in Zusammenhang stehen mag.

Die für einige Enzyme des reduktiven Pentosephosphatcyclus erhaltenen spezifischen Aktivitäten erscheinen als zu niedrig, besonders bei Aldolase und Ribulosediphosphat-Carboxylase. Diese Beobachtung wurde u. a. auch an *Chlorella pyrenoidosa* und *Euglena gracilis* durch PETERKOFSKY u. RACKER (1961), sowie von GOTTSCHALK (1964) an *Hydrogenomonas* Stamm *H 16* gemacht. Bei *Anacystis nidulans* (RICHTER 1959) und anderen *Cyanophyceae* wurde überhaupt keine Aldolase gefunden, in *Rhodopseudomonas spheroides* (SZYMONA u. DOUDOROFF 1960) nur Spuren des Enzyms. Erst kürzlich verglichen KINDEL u. GIBBS (1963) die spezifische Markierung in den Polysacchariden von *Chlorella* und *Anacystis* und stellten fest, daß diese gleich war. Abgesehen davon, daß durch bestimmte Präparationsmethoden die vorhandene Aldolaseaktivität zerstört worden sein könnte, wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß Aldolase nicht an der Polysaccharidsynthese beteiligt ist. Diese Fragen sind von STILLER (1962) in Zusammenhang mit der vielfach sehr frühen starken Markierung in den Hexose- und Pentosephosphaten noch vor den Triosephosphaten ausführlich diskutiert worden.

Mit der Acetyl-CoA-abhängigen Pyruvatcarboxylase besitzt *Chromatium okenii* neben der Ribulosediphosphat-Carboxylase wie Stamm *D* ein zweites sehr aktives CO_2-fixierendes Enzym. Seit seiner Entdeckung

durch Utter u. Keech (1960) in Lebermitochondrien ist dieses Enzym nur in den beiden *Chromatium*-Arten gefunden worden. Dem Acetyl-CoA kommt bei seiner Wirkung sehr wahrscheinlich eine wichtige regulatori-

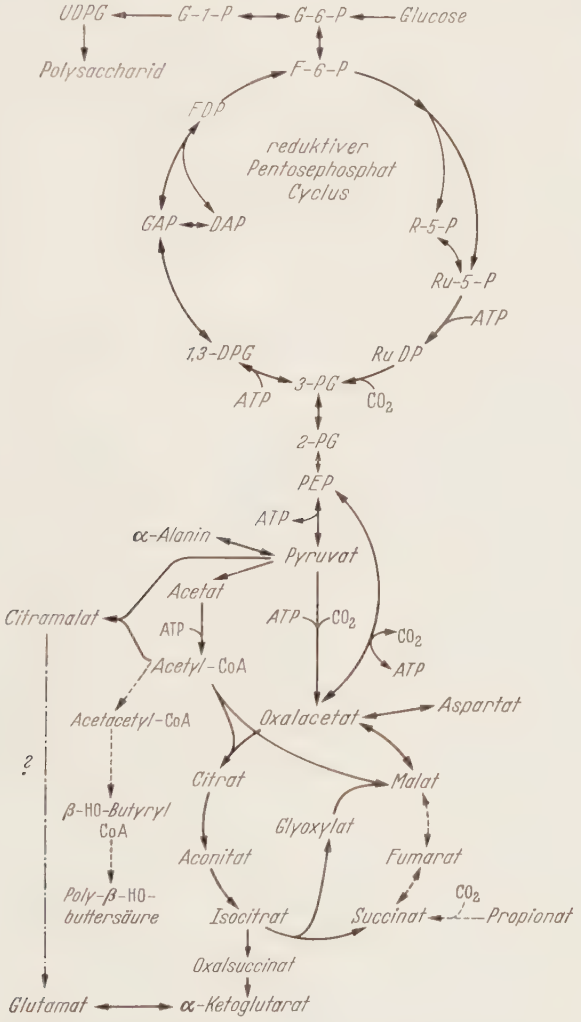

Abb. 10. C-Stoffwechsel in *Chromatium okenii*. Die mit unterbrochenen Linien gekennzeichneten Reaktionen folgen aus Untersuchungen von Kran (1964) und Stahl (persönliche Mitteilung)

sche Funktion zu: Ist im Stoffwechsel genügend Acetyl-CoA vorhanden, so wird Pyruvat zu Oxalacetat carboxyliert, mit dessen Hilfe dann das vorhandene Acetyl-CoA über das condensing enzyme in den Glyoxylatcyclus eingeht. Wie Pfennig (1962) beobachtete, wirken geringe Acetat-

mengen im Normalmedium auf *Chromatium okenii* wachstumsfördernd. Es ist denkbar, daß in diesem Falle eine Stimulation der Pyruvat-Carboxylase erfolgt, wodurch wiederum der Glyoxylatcyclus stärker induziert wird. Eine gleichzeitige Verwertung von Acetat als C-Quelle zum Wachstum und als H-Donator zur Photosynthese (ohne Sulfid im Medium) konnte bei *Chromatium okenii* bisher nicht beobachtet werden. *Chromatium* Stamm *D* ist hierzu imstande, allerdings nur unter einer inerten Gasatmosphäre (Argon) (ARNON et al. 1963). Unter H_2-Atmosphäre bildet *Chromatium* Stamm *D* bis 74% des Zell-C Poly-β-hydroxybuttersäure. Bei *Chromatium okenii* wird Poly-β-hydroxybuttersäure bei Inkubation mit Acetat und Sulfid im Licht angehäuft. H_2 ist dazu nicht notwendig; Hydrogenase ist nicht vorhanden (SCHLEGEL 1962a, 1962b, KRAN 1964; TRÜPER 1964).

In bezug auf seinen Tricarbonsäure- bzw. Glyoxylatcyclus nimmt *Chromatium okenii* zwischen *Chromatium* Stamm *D* und *Rhodospirillum rubrum* eine Mittelstellung ein. Das zu einem oxydativen Stoffwechsel im Dunkeln befähigte *Rhodospirillum rubrum* verfügt über einen kompletten Tricarbonsäurecyclus. Im Gegensatz zu Stamm *D* hat *Chromatium okenii* mit ihm das Enzym Malatdehydrogenase gemeinsam. Stamm *D* muß dieses Enzym durch einen ATP-benötigenden Umweg über Pyruvat ersetzen. Beide *Chromatium*-Arten verfügen über die Enzyme des Glyoxylatcyclus und beiden fehlt α-Ketoglutaratdehydrogenase. Bei *Rhodopseudomonas spheroides* und *Rhodospirillum rubrum* fehlt Isocitratase. TSUIKI et al. (1963) schlagen für den Acetateinbau im Licht durch *Rhodopseudomonas spheroides* einen neuen Mechanismus vor, der im wesentlichen auf der Funktion der Malatsynthetase beruht. In Kurzzeitversuchen mit ^{14}C-Acetat stellten sie sehr frühe Markierung in Glycolat/Glyoxylat und Malat fest und schließen daraus, daß durch direkte Oxydation von Acetat Glyoxylat gebildet wird, das mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zu Malat zusammentritt. Eine Sicherung dieses Weges durch enzymologische Methoden steht allerdings noch aus.

Mit CO_2 als einziger C-Quelle gezogene *Chromatium okenii*-Zellen verfügen nicht über das malic enzyme — im Gegensatz zu *Chromatium* Stamm *D* und *Rhodospirillum rubrum* (VERNON u. KAMEN 1953). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß das Enzym durch Wachstum mit Succinat oder Malat induzierbar ist. Da in *Chromatium okenii* Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase vorhanden ist, verfügt der Organismus auch ohne malic enzyme über eine reversible Verbindung zwischen Glyoxylatcyclus und Kohlenhydratstoffwechsel.

Zusammenfassung

1. Es wurde die CO_2-Fixierung durch *Chromatium okenii*, einen der großen Vertreter der Gattung *Chromatium*, untersucht. Zu diesem Zweck

wurde ein Versuchsgefäß entwickelt, das geeignete Beleuchtbarkeit, anaerobes Arbeiten, magnetische Rührung und die schnelle Entnahme gleichgroßer Proben ermöglichte, ohne daß die Bakterien durch Sauerstoff geschädigt wurden.

2. Die CO_2-Fixierungsrate, die mit Sulfid oder Intracellularschwefel gleich hoch war, war bei ausreichender Versorgung mit dem entsprechenden H-Donator über annähernd 2 Std konstant. Die maximale CO_2-Fixierungsrate betrug 0,069 μMol CO_2/min/mg Protein bei einer Beleuchtungsstärke von 2000 Lux.

3. Kurzzeit-$^{14}CO_2$-Einbauversuche ergaben, daß die ersten stabilen Produkte der CO_2-Fixierung Phosphoglycerat und Aspartat sind. Sehr wahrscheinlich ist der gesamte Pentosephosphatcyclus in *Chromatium okenii* vorhanden.

4. Phosphoribulokinase, Ribulosediphosphat-Carboxylase sowie alle zur Synthese eines Polysaccharids notwendigen Enzyme wurden in zellfreien Extrakten nachgewiesen.

5. *Chromatium okenii* verfügt über die Enzyme des Verbindungsweges zwischen Pentosephosphat- und Tricarbonsäurecyclus. Die zweite Haupt-CO_2-Fixierungsreaktion wird durch eine Acetyl-CoA-abhängige Pyruvat-Carboxylase katalysiert, die zusammen mit der ebenfalls vorhandenen Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase das Oxalacetat als Vorläufer des Aspartats bereitstellt.

6. Alle Enzyme des Tricarbonsäure- und Glyoxylatcyclus außer α-Ketoglutarat-Dehydrogenase konnten in zellfreien Extrakten nachgewiesen werden. Fumarase und Succinat-Dehydrogenase wurden nicht getestet, auf ihr Vorhandensein kann aus Versuchen an ganzen Zellen geschlossen werden.

7. Acetyl-CoA kann aus Pyruvat nur über das freie Acetat gebildet werden. Ein Acetat-aktivierendes Enzymsystem wurde nachgewiesen.

8. *Chromatium okenii* verfügt über die zur Bildung von Glutamat, Aspartat und α-Alanin notwendigen Transaminasen. Da ein Citramalat-bildendes Enzym, die Pyruvat-Transacetase, nachgewiesen wurde, kann eine Glutamatsynthese über Citramalat nicht ausgeschlossen werden.

Summary

1. CO_2-fixation of *Chromatium okenii* as a representative of the large species of the genus *Chromatium* was studied. Therefore a reaction vessel was developed that guaranteed appropriate illumination, anaerobiosis, magnetic stirring, and quick removal of aliquote samples without damaging the bacteria with oxygen.

2. The rate of CO_2-fixation being the same with sulfide or intracellular sulfur remains constant for approximately 2 hours if the cells

are supplied with sufficient amounts of H-donor. The maximum CO_2-fixation rate was found to be 0.069 μmoles CO_2/min/mg of protein at a light intensity of 2000 lux.

3. Short time exposure experiments with $^{14}CO_2$ showed that the first stable products of CO_2-fixation are phosphoglycerate and aspartate. Probably the whole pentose phosphate cycle is present in *Chromatium okenii*.

4. Phosphoribulokinase, ribulose diphosphate carboxylase, and all enzymes for the synthesis of a polysaccharide were demonstrated in cell free extracts.

5. *Chromatium okenii* contains the enzymes connecting the pentose phosphate and tricarboxylic acid cycles. The second predominating CO_2-fixation reaction was found to be catalysed by an acetyl-CoA-dependent pyruvate carboxylase, which together with phosphoenol-pyruvate carboxykinase forms oxaloacetate as the precursor of aspartate.

6. All enzymes of the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles, except α-oxoglutarate dehydrogenase, were found in cell free extracts. Fumarase and succinate dehydrogenase were not tested, their presence may be deduced from whole cell experiments.

7. Acetyl-CoA can be formed from pyruvate only via free acetate. An acetate activating system was demonstrated.

8. Transaminases necessary for the formation of glutamate, aspartate, and α-alanin as well as a citramalate condensing enzyme, pyruvate transacetase, were found to be present. The synthesis of glutamate via citramalate therefore can not be excluded.

Herrn Professor Dr. H. G. SCHLEGEL danke ich für die Überlassung des Themas, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und für viele wertvolle Hinweise. Herrn Professor Dr. N. PFENNIG danke ich für wichtige Ratschläge zur Wachstumsphysiologie. Die Arbeit wurde gefördert mit Hilfe von Forschungsmitteln des Landes Niedersachsen.

Literatur

ARNON, D. I., V. S. R. DAS, and J. D. ANDERSON: Metabolism of photosynthetic bacteria. I. Effect of carbon source and hydrogen gas on biosynthetic patterns in *Chromatium*. Microalgae and Photosynthetic Bacteria (Sonderband von Plant and Cell Physiol.) 529 (1963).

BARKER, H. A.: Bacterial fermentations. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1956.

BASSHAM, J. A., A. A. BENSON, L. D. KAY, A. Z. HARRIS, A. T. WILSON, and M. CALVIN: The path of carbon in photosynthesis. XXI. The cyclic regeneration of carbon dioxide acceptor. J. Amer. chem. Soc. **76**, 176 (1954).

BENEDICT, C. R.: Early products of (^{14}C) acetate incorporation in resting cells of *Rhodospirillum rubrum*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **56**, 620 (1962).

BERG, P.: Acyl adenylates: An enzymatic mechanism of acetate activation. J. biol. Chem. **222**, 991 (1956).

BOHLKEN, G.: Pers. Mitteilung.

Brenner, M., A. Niederwieser u. G. Pataki: In E. Stahl: Dünnschichtchromatographie, S. 403. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1962.

Breuker, E.: Die Verwertung von intracellulärem Schwefel durch *Chromatium vinosum* im aeroben und anaeroben Licht- und Dunkelstoffwechsel. Dissertation. Göttingen 1963.

Bücher, Th.: Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **1**, 292 (1947).

Cannata, J. J. R., and A. O. M. Stoppani: Adenosine polyphosphate requirement of baker's yeast phosphopyruvate carboxylase. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **32**, 284 (1959).

Crook, P. G., and E. S. Lindstrom: A comparison of the oxidative metabolism of light and dark grown *Rhodospirillum rubrum*. Canad. J. Microbiol. **2**, 427 (1956).

Dixon, G. H., and H. L. Kornberg: Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. Biochem. J. **69**, 3P (1959).

Ehrenberg, C. G.: Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen. Leipzig 1838.

Eisenberg, M. A.: The tricarboxylic acid cycle in *Rhodospirillum rubrum*. J. biol. Chem. **203**, 815 (1953).

— The acetate-activating enzyme of *Rhodospirillum rubrum*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **16**, 58 (1955).

Elsden, S. R.: Photosynthetic and lithotrophic carbon dioxide fixation. In I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier: The bacteria, Vol. III. p. 1. New York: Academic Press 1962.

—, and J. G. Ormerod: The effect of monofluoroacetate on the metabolism of *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J. **63**, 691 (1956).

Fuller, R. C., and H. L. Kornberg: A possible route for malate oxidation by *Chromatium*. Biochem. J. **79**, 8 P (1961).

— R. M. Smillie, E. C. Sisler, and H. L. Kornberg: Carbon metabolism in *Chromatium*. J. biol. Chem. **236**, 2140 (1961).

Gest, H., J. G. Ormerod, and K. S. Ormerod: Photometabolism of *Rhodospirillum rubrum*: Light-dependent dissimilation of organic compounds to carbon dioxide and molecular hydrogen by an anaerobic citric acid cycle. Arch. Biochem. **97**, 21 (1962).

Gottschalk, G.: Die Biosynthese der Poly-β-hydroxybuttersäure durch Knallgasbakterien. III. Synthese aus Kohlendioxyd. Arch. Mikrobiol. **47**, 236 (1964).

Gray, C. T., and H. L. Kornberg: Enzymic formation of citramalate from acetylcoenzyme A and pyruvate in *Pseudomonas ovalis* Chester, catalysed by "pyruvate transacetase". Biochim. biophys. Acta (Amst.) **42**, 371 (1960).

Hirsch, P.: CO_2-Fixierung durch Knallgasbakterien. II. Chromatographischer Nachweis der frühzeitigen Fixierungsprodukte. Arch. Mikrobiol. **46**, 53 (1963).

— G. Georgiev u. H. G. Schlegel: CO_2-Fixierung durch Knallgasbakterien. III. Autotrophe und organotrophe CO_2-Fixierung. Arch. Mikrobiol. **46**, 79 (1963).

Hoare, D. S.: The photometabolism of (1-^{14}C) acetate and (2-^{14}C) acetate by washed cell suspensions of *Rhodospirillum rubrum*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **59**, 723 (1962a).

— The photoassimilation of acetate to glutamate in washed cell suspensions of *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J. **84**, 94 P (1962b).

— The photoassimilation of acetate by *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J. **87**, 284 (1963).

HOLZER, H., u. H. W. GOEDDE: Oxydation von α-Ketosäuren und einigen Aldehyden mit Pyruvat-Decarboxylase aus Hefe. Biochem. Z. **320**, 192 (1957).

HUGHES, B. E.: A press for disrupting bacteria and other microorganisms. Brit. J. exp. Path. **32**, 97 (1951).

IZAWA, S.: Methylene blue inhibition of photosynthesis in *Rhodopseudomonas palustris*. Plant and Cell Physiol. **3**, 43 (1962).

KAUFMAN, S.: In S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN: Methods in enzymology, Vol. I, p. 714. New York: Academic Press 1955.

KEECH, D. B., and M. F. UTTER: Pyruvate carboxylase. J. biol. Chem. **238**, 2609 (1963).

KINDEL, P., and M. GIBBS: Distribution of carbon-14 in polysaccharide after photosynthesis in carbon dioxide labelled with carbon-14 by *Anacystis nidulans*. Nature (Lond.) **200**, 260 (1963).

KNIGHT, M.: The photometabolism of propionate by *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J. **84**, 170 (1962).

KRAN, G.: Unveröffentlicht.

LAFFERTY, R. M.: Kohlendioxyd-Fixierung durch organotrophe Bakterien. Arch. Mikrobiol. **44**, 373 (1963).

LA RIVIÈRE, J. W. M.: On the microbial metabolism of the tartaric acid isomeres. Dissertation. Delft 1958.

LARSEN, H.: Photosynthesis of succinic acid by *Chlorobium thiosulphatophilum*. J. biol. Chem. **193**, 167 (1951).

LASCELLES, J.: The formation of ribulose-1:5-diphosphate carboxylase by growing cultures of *Athiorhodaceae*. J. gen. Microbiol. **23**, 499 (1960).

LIAAEN JENSEN, S., u. K. SCHMIDT: Die Carotinoide der *Thiorhodaceae*. III. Die Carotinoide von *Chromatium warmingii* Migula. Arch. Mikrobiol. **46**, 138 (1963).

LOSADA, M., A. V. TREBST, S. OGATA, and D. I. ARNON: Equivalence of light and adenosine triphosphate in bacterial photosynthesis. Nature (Lond.) **186**, 753 (1960).

NEWTON, J. W., and G. A. NEWTON: Composition of the photoactive subcellular particles from *Chromatium*. Arch. Biochem. **71**, 250 (1947).

OCHOA, S.: Biosynthesis of tricarboxylic acids by carbon dioxide fixation. III. Enzymatic mechanisms. J. biol. Chem. **174**, 133 (1948).

— In S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN: Methods in enzymology, Vol. I, p. 739. New York: Academic Press 1955a.

— In S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN: Methods in enzymology, Vol. I, p. 735. New York: Academic Press 1955b.

OHMANN, E.: Verschiedene Mechanismen der Acetataktivierung in Grünalgen. Naturwissenschaften **50**, 578 (1963).

PETERKOFSKY, A., and E. RACKER: The reductive pentose phosphate cycle. III. Enzyme activities in cell-free extracts of photosynthetic organisms. Plant Physiol. **36**, 409 (1961).

PFENNIG, N.: Eine vollsynthetische Nährlösung zur selektiven Anreicherung einiger Schwefelpurpurbakterien. Naturwissenschaften **48**, 136 (1961).

— Über die Kultur von *Chromatium okenii*. Vorträge a. d. Gesamtgebiet d. Bot. (Neue Folge) **1**, 83 (1962).

POTTER, V. R., and C. A. ELVEHJEM: A modified method for the study of tissue oxidations. J. biol. Chem. **114**, 495 (1935).

RACKER, E.: The reductive pentose phosphate cycle. I. Phosphoribulokinase and ribulose diphosphate carboxylase. Arch. Biochem. **69**, 300 (1957).

—, and E. A. R. SCHROEDER: The reductive pentose phosphate cycle. II. Specific C_1-phosphatases for fructose-1,6-diphosphate and sedoheptulose-1,7-diphosphate. Arch. Biochem. **74**, 326 (1958).

Richter, G.: Comparison of enzymes of sugar metabolism in two photosynthetic algae: *Anacystis nidulans* and *Chlorella pyrenoidosa*. Naturwissenschaften **46**, 604 (1959).

Roelofsen, P. A.: On the metabolism of the purple sulphur bacteria. Proc. kon. ned. Acad. Wet. **37**, 660 (1934).

Rose, I. A.: In S. P. Colowick and N. O. Kaplan: Methods in enzymology, Vol. I, p. 591. New York: Academic Press 1955.

Schindler, J.: Die Synthese von Poly-β-hydroxybuttersäure durch *Hydrogenomonas H 16*. Die zu β-Hydroxybutyryl-CoA führenden Reaktionen. Arch. Mikrobiol. (im Druck) (1964).

Schlegel, H. G.: Die Speicherstoffe von *Chromatium okenii*. Arch. Mikrobiol. **42** 110 (1962a).

— Die Bildung von Speicherstoffen durch Knallgas- und Purpurbakterien. Vorträge a. d. Gesamtgebiet d. Bot. (Neue Folge) **1**, 167 (1962b).

— Die Rolle des Kohlendioxyds im Stoffwechsel der Mikroorganismen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **191**, 177 (1963).

—, u. G. Gottschalk: Poly-β-hydroxybuttersäure, ihre Verbreitung, Funktion und Synthese. Angew. Chem. **74**, 342 (1962).

— — u. R. Bartha: Formation and utilization of poly-β-hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). Nature (Lond.) **191**, 463 (1961).

—, u. R. M. Lafferty: Radioaktivitätsmessungen an Einzellern auf Membranfiltern. Arch. Mikrobiol. **38**, 52 (1961).

—, u. N. Pfennig: Die Anreicherungskultur einiger Schwefelpurpurbakterien. Arch. Mikrobiol. **38**, 1 (1961).

Schmidt, K., S. Liaaen Jensen u. H. G. Schlegel: Die Carotinoide der *Thiorhodaceae*. I. Okenon als Hauptcarotinoid von *Chromatium okenii* Perty. Arch. Mikrobiol. **46**, 117 (1963).

Shriner, R. L., R. C. Fuson, and D. Y. Curtin: The systematic identification of organic compounds, p. 219. 4. Aufl. New York: Wiley & Sons, Inc. 1956.

Shuster, C. W., and M. Doudoroff: A cold-sensitive D(-)β-hydroxybutyric acid dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. J. biol. Chem. **237**, 603 (1962).

Smillie, R.: Alkaline C-1 fructose-1,6-diphosphatase: Evidence for its participation in photosynthesis. Nature (Lond.) **187**, 1024 (1960).

—, and R. C. Fuller: Further observations on glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases in plants and photosynthetic bacteria. Biochem. biophys. Res. Commun. **3**, 368 (1960).

— N. Rigopoulos, and H. Kelly: Enzymes of the reductive pentose phosphate cycle in the purple and in the green sulphur bacteria. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **56**, 612 (1962).

Smith, J. E.: Transamination reactions in uredospores of *Puccinia helianthi*. J. gen. Microbiol. **30**, 35 (1963).

Stahl, I.: Pers. Mitteilung.

Stiller, M.: The path of carbon in photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. **13**, 151 (1962).

Stoppani, A. O. M., R. C. Fuller, and M. Calvin: Carbon dioxide fixation in *Rhodopseudomonas capsulatus*. J. Bact. **69**, 491 (1955).

Strecker, H. J.: In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan: Methods in enzymology, Vol. II, p. 220. New York: Academic Press 1955.

Suzuki, I., and C. H. Werkman: Chemoautotrophic carbon dioxide fixation by extracts of *Thiobacillus thiooxidans*. I. Formation of oxalacetic acid. Arch. Biochem. **76**, 103 (1958).

Szymona, M., and M. Doudoroff: Carbohydrate metabolism in *Rhodopseudomonas spheroides*. J. gen. Microbiol. **22**, 167 (1960).

Tietz, A., and S. Ochoa: In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan: Methods in enzymology, Vol. V, p. 571. New York: Academic Press 1962.

Trüper, H. G.: CO_2-Fixierung und Intermediärstoffwechsel bei *Chromatium okenii* Perty. Dissertation. Göttingen 1964.

Tsuiki, S., A. Muto, and G. Kikuchi: A possible route of acetate oxydation in *Rhodopseudomonas spheroides*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **69**, 181 (1963).

Utter, M. F., and D. B. Keech: Formation of oxaloacetate from pyruvate and CO_2. J. biol. Chem. **235**, PC17 (1960).

— — Pyruvate carboxylase. I. Nature of the reaction. J. biol. Chem. **238**, 2603 (1963).

—, and K. Kurahashi: In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan: Methods in enzymology, Vol. I, p. 758. New York: Academic Press 1955.

Van Niel, C. B.: On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria. Arch. Mikrobiol. **3**, 1 (1932).

— On the metabolism of the *Thiorhodaceae*. Arch. Mikrobiol. **7**, 323 (1936).

— The bacterial photosyntheses and their importance for the general problem of photosynthesis. Advanc. Enzymol. **1**, 263 (1941).

Vernon, L. P., and M. D. Kamen: Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. XV. Photoautoxidation of ferrocytochrome c in extracts of *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Biochem. **44**, 298 (1953).

Vishniac, W., and P. A. Trudinger: Symposium on autotrophy. V. Carbon dioxide fixation and substrate oxidation in the chemosynthetic sulfur and hydrogen bacteria. Bact. Rev. **26**, 168 (1962).

Wiame, J. M., J. Piérard, and F. Ramos: In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan: Methods in enzymology, Vol. V, p. 673. New York: Academic Press 1962.

Wolf, H. P.: In: H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 732. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1962.

Wood, H. G., S. H. G. Allen, R. Stjernholm, and B. Jacobson: Transcarboxylase. III. Purification and properties of methylmalonyl-oxaloacetic transcarboxylase containing tritiated biotin. J. biol. Chem. **238**, 547 (1963).

—, and R. Stjernholm: Assimilation of carbon dioxide by heterotrophic organisms. In: I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier: The bacteria, Vol. III, p. 41. New York: Academic Press 1962.

Dr. Hans G. Trüper,
Institut für Mikrobiologie der Universität, 34 Göttingen, Goßlerstr. 16

Lebenslauf

Als Sohn des Bauingenieurs und Landwirts Johannes D. Trüper und seiner Ehefrau Helga, geb. Harms, wurde ich am 16.3.1936 in Bremen-Aumund geboren. Ich besuchte die Grundschule in Bremen-Farge und das Gerhard-Rohlfs-Gymnasium in Bremen-Vegesack, an dem ich am 1.3.1955 die Reifeprüfung ablegte. Zum Sommersemester 1955 ließ ich mich an der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn zum Studium der Naturwissenschaften immatrikulieren. Mit dem Wintersemester 1958/59 wechselte ich an die Georg-August-Universität Göttingen. Seit März 1960 war ich am Institut für Mikrobiologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Schlegel mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt.

Meinen akademischen Lehrern fühle ich mich zu großem Dank verpflichtet. Es sind dies die Herren Professoren Birukow, Deuticke, Dimroth, Flammersfeld, Hollmann, Jost, Kessel, Kockel, Mahr, Mattes, Metzner, R. Meyer, Pfeil, Pfennig, Pirson, Schlegel, Seidel, Thiele und Walcher, sowie die Herren Dozenten Beermann, Harbers, Jannasch, Kellner, W. Koch, Schütte und Wahl.